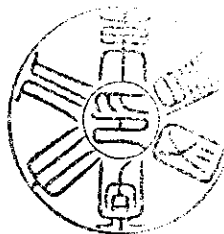




重イオンマイクロビームによる生殖細胞の放射線影響とバイスタンダー効果の研究

著者	東谷 篤志
URL	http://hdl.handle.net/10097/39801



重イオンマイクロビームによる生殖細胞の
放射線影響とバイスタンダー効果の研究

16310033

平成 16 年度～平成 19 年度 科学研究費補助金
(基盤研究(B)) 研究成果報告書

平成 20 年 5 月

研究代表者 東谷 篤志
東北大学 大学院生命科学研究科 教授

(はしがき)

細胞が電離放射線（以下、放射線と記す）により被曝した際、高頻度に DNA の二本鎖切断が生じること、さらに活性酸素種（ROS）が細胞内で生成することなどが知られている。さらに近年、低線量の放射線被曝による生物効果や放射線マイクロビーム照射装置の開発により、ゲノム DNA が直接的な損傷を受けない場合でも、細胞は様々な放射線の影響を感受していることが示唆されてきた。なかでもマイクロビーム照射装置の開発により、直接放射線の被曝を受けなかった周辺の細胞においても、放射線の影響を感受し、様々な生物応答に至るバイスタンダー効果が存在することが知られてきた。本研究では、主に日本原子力研究開発機構の重イオンマイクロビーム照射装置を用いて、線虫 *C. elegans* の生殖細胞形成における放射線の影響、特に DNA 損傷の修復、アポトーシス、そしてバイスタンダー効果に関する分子機構について解明することを研究目的とした。

モデル生物の一つである線虫 *C. elegans* は、逆遺伝学的ならびに遺伝学的解析が容易でかつ、また減数分裂過程を含む生殖細胞の発生と染色体ダイナミクスが同調性良く進行し、それぞれの段階を実験材料として用いることができる点に大きな特色がある。またこれら生殖細胞の形成過程は、ヒトをはじめとする有性生殖を行なう生物に普遍的かつ共通の遺伝的基盤を有することが明らかになってきた。卵母細胞においては、減数第一分裂前期の後半で受精に備え、細胞周期を一時的に停止させ、ヒトなどではその期間は数十年間にもおよぶことも知られている。生殖細胞の核や細胞質における放射線の影響に関する研究は、世代を越えて調べる必要性があり実験上の困難さを要したが、線虫では世代交代が早く研究材料としての大きなもう一つの特色があげられる。そこで本

研究では、世界的にも先駆的な重イオン線マイクロビーム照射装置、ならびにその他の X 線、ガンマー線などの放射線照射装置、さらに MRI など近年良く利用される直流強磁場照射を東北大学金属研究所との共同研究体制で利用して、これらが及ぼす生物影響を約 2 万の全ゲノム遺伝子の発現変動のレベルで調べるという大変独創的な試みである。さらに、これら 2 万遺伝子の約 4 割はヒトにおいても共通の働きをする保存された遺伝子であると考えられている。従って、今回、得られる成果は、単に線虫における生命現象の解明に留まるのではなく、真核生物に広く当てはまる、新規性の高い意義深いものであると予想された。

この 4 年間の研究機期間において得られた成果として、大きく以下の 6 点があげられる。

- (1) 放射線損傷により、細胞分裂阻害タンパク質 CKI1 が一過的に発現誘導され、生殖幹細胞の分裂を停止させる。その分解には Elongin B, C-Cul2-RBX1 からなる ubiquitin E3 複合体が関わることを、RNAi 法を用いた発現抑制個体の作出とそれらの生化学的な解析により解明した。また、その複合体は卵母細胞における減数第二分裂の過程に必須であることを明らかにした (Sasagawa et al. 2005)。
- (2) 上記研究の発展として、卵母細胞の成熟に不可欠な MAP kinase MPK1 の活性化には RBX1-CUL2 複合体と RBX2-CUL5 複合体が重複して働くことをそれぞれの変異体、RNAi 個体、さらに二重抑制個体等を用いた系により解明した (Sasagawa et al. 2007)。
- (3) 重イオンマイクロビーム照射装置を用いて、線虫個体の各部位(頭部、尾部、生殖幹細胞部、減数分裂パキテン期の生殖細胞部、成熟卵細胞部)にそれぞれ放射線照射を行い、生殖細胞における細胞分裂の停止、アポトーシスの誘導な

どについて調べた。その結果、生殖幹細胞部では細胞分裂の停止が、減数分裂パキテン期の生殖細胞部ではチェックポイント制御機構によるアポトーシスの誘導がそれぞれ優位に生じることが観察された。一方で、頭部や尾部における照射では生殖細胞の細胞分裂の停止ならびにアポトーシスの誘導については観察することができず、さらに、片側の生殖腺に照射した際、同一個体の反対側の生殖腺ではこれら応答も観察されず、線虫の生殖腺においては放射線照射によるバイスタンダー効果を見出すことができなかった (Sugimoto et al. 2006)。今回、細胞分裂の停止やアポトーシスの誘導というエンドポイントを設定したが、今後はより感受性の高い放射線応答遺伝子の発現誘導等のシステムを構築して、さらに研究を展開する必要性が示唆された。また、本系で用いた重イオンマイクロビーム照射装置の部位特異的な照射精度とその利用が、体長 1mm の線虫においても十分有効に働くことが実証された (Sugimoto et al. 2006)。

(4) 線虫全ゲノム (約 2 万遺伝子) に対応する DNA マイクロアレイを用いた解析により、放射線照射により発現誘導される遺伝子群を明らかにした (Kimura et al. in press)。また、放射線は DNA の二本鎖切断に加えて、細胞内の水分子を直接活性化することで ROS を生成することも知られている。そこで、ミトコンドリア DNA 複製をミトコンドリア DNA 一本鎖結合タンパク質の RNAi により阻害し、ミトコンドリア障害を生じさせた場合の DNA マイクロアレイ解析と比較した。その結果、放射線照射により 2 倍以上発現が誘導された 263 遺伝子の内、約半数の 113 遺伝子はミトコンドリア障害においても発現誘導されること、その中には、幾つかの glutathione S transferase 遺伝子などが含まれていることを明らかにした。一方で、ミトコンドリア障害においてのみ特異的に発現誘導する遺伝子も多数見出され、そのなかには低酸素応答に関わる遺伝子群が含まれていることを見出した (Sugimoto et al. 2008)。本成果は、同論文が

掲載された *Experimental Cell Research* の同号における”HIGHLIGHTS”論文として取り上げられた。

(5) 近年、医療診断において直流強磁場を用いた MRI 装置が広く用いられている。そこで、本研究では放射線照射と直流強磁場の被曝による生物分子応答の比較を同じく線虫ゲノム DNA マイクロアレイを用いて行った。その結果、放射線照射による応答と直流強磁場による応答は、大きく異なり、遺伝子発現の変動において共通する応答はほとんど見られないことが明らかになった (Kimura et al. in press)。

(6) また、国際宇宙ステーションの利用、有人による火星探索など、人類が宇宙空間に出る機会は、今後、益々増えると考えられている。一方で、宇宙空間では重イオン線をはじめとする強力な宇宙放射線に被曝する危険性が示唆されている。そこで、私たちは国際線虫宇宙実験 *International C. elegans Space Experiment 1st (ICE first)* に参画し、宇宙の無重力環境下でもアポトーシスが正常に働くかどうか明らかにすることを、本研究の一環として実施した。その結果、線虫の生殖腺におけるパキテンチェックポイント制御アポトーシスならびに卵細胞の成熟に伴う生理的なアポトーシスが、宇宙の微小重力下でも正常に機能することを明らかにした (Higashitani et al. 2005)。特にチェックポイント制御のアポトーシスは、減数分裂期の相同染色体間の遺伝子組換えをモニターしているものと考えられており、DNA の二本鎖切断の組換え修復の欠陥時に生じる。すなわち、パキテンチェックポイント制御アポトーシスが宇宙環境下でも地上と同様に正常に行われることを今回はじめて証明できたことは、もし強力な宇宙放射線により被曝した際も、傷ついた細胞はアポトーシスにより除去され、娘細胞に遺伝的変異を蓄積しないものと考えられる。

以上、モデル生物の1つである線虫を用いて、その生殖細胞形成における放射線の影響、特に DNA 損傷の修復、アポトーシス、そしてバイスタンダー効果に関する分子機構の新たな知見が、本研究の遂行により得られたといえる。

最後に、本研究を進める上で当研究室の多くの大学院生をはじめ、日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門の多くの研究員・技術職員、その他の共同研究者の方々に深くお礼申し上げます。

(研究組織)

研究代表者： 東谷 篤志（東北大学大学院生命科学研究科 教授）

研究分担者： 小林 泰彦（日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究
部門 マイクロビーム細胞照射研究グループリーダー）

交付決定額（配分額） （金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成16年度	4,300,000	0	4,300,000
平成17年度	3,800,000	0	3,800,000
平成18年度	3,800,000	0	3,800,000
平成19年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
総計	15,500,000	1,080,000	16,580,000

(研究発表)

(1) 雑誌論文 (査読有)

Sasagawa Y, Kikuchi K, Dazai K, Higashitani A.

Caenorhabditis elegans Elongin BC complex is essential for cell proliferation and chromosome condensation and segregation during mitosis and meiotic division II.

Chromosome Research. 2005; 13(4):357-375.

Higashitani A, Higashibata A, Sasagawa Y, Sugimoto T, Miyazawa Y,

Szewczyk NJ, Viso M, Gasset G, Eche B, Fukui K, Shimazu T, Fujimoto N, Kuriyama K, Ishioka N.

Checkpoint and physiological apoptosis in germ cells proceeds normally in spaceflown *Caenorhabditis elegans*.

Apoptosis. 2005; 10(5):949-954.

Sugimoto T, Dazai K, Sakashita T, Funayama T, Wada S, Hamada N,

Kakizaki T, Kobayashi Y, Higashitani A.

Cell cycle arrest and apoptosis in *Caenorhabditis elegans* germline cells following heavy-ion microbeam irradiation.

International Journal of Radiation Biology. 2006; 82(1):31-38.

Sasagawa Y, Sato S, Ogura T, Higashitani A.

C. elegans RBX-2-CUL-5 and RBX-1-CUL-2-based complexes are redundant for oogenesis and activation of the MAP kinase MPK-1.

FEBS Letter. 2007; 581(1):145-150.

Sugimoto T, Mori C, Takanami T, Sasagawa Y, Saito R, Ichiishi E,
Higashitani A.

Caenorhabditis elegans par2.1/mtssb-1 is essential for mitochondrial DNA replication and its defect causes comprehensive transcriptional alterations including a hypoxia response.

Experimental Cell Research. 2008; 314(1):103-114.

(Selected as “HIGHLIGHTS” in this issue)

Kimura T, Takahashi K, Suzuki Y, Konishi Y, Ota Y, Mori C, Ikenaga T,
Takanami T, Saito R, Ichiishi E, Awaji S, Watanabe K, Higashitani A.

The effect of high strength static magnetic fields and ionizing radiation on gene expression and DNA damage in *Caenorhabditis elegans*.

Bioelectromagnetics. 2008; in press

(2) 学会発表

東谷篤志、杉本朋子、太斎久美子、坂下哲哉、舟山知夫、和田成一、柿崎竹彦、
小林泰彦

重イオンマイクロビームによる放射線影響とバイスタンダー効果の研究

第14回 TIARA研究発表会 2005年6月23-24日 高崎市 群馬県

Tomoko Sugimoto, Atsushi Higashitani

Characterization of *C. elegans* par2.1 gene and construction of
mitochondria-deficient animals

International Conference on Mitochondria and Life 2005, Dec. 14-17, Tokyo

東谷篤志

線虫を用いた生殖細胞系列におけるDNA損傷の応答機構の解明

日本組織培養学会創立50周年記念国際シンポジウム・日本放射線影響学会若手
放射線生物研究会合同シンポジウム（招待講演）2006年5月24-26日 東京

Tomoko Sugimoto, Eiichiro Ichiishi, Rumiko Saito, Atsushi Higashitani

Characterization of *C. elegans* mtSSB gene and construction of
mitochondria-deficient animals

20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology
and 11th FAOBMB Congress 2006, June 18-23, Kyoto

東谷篤志、森ちひろ、杉本朋子、太斎久美子、坂下哲哉、舟山知夫、柿崎竹彦、
浜田信行、和田成一、小林泰彦

重イオンマイクロビームを用いた線虫*C. elegans*の放射線応答の研究

第49回 日本放射線影響学会大会 2006年9月6-8日 札幌

森ちひろ、池永敬彦、杉本朋子、太斎久美子、坂下哲哉、舟山知夫、柿崎竹彦、
浜田信行、和田成一、小林泰彦、一石英一郎、斎藤るみ子、東谷篤志

モデル生物線虫*C. elegans*の生殖細胞における放射線応答の研究

第49回 日本放射線影響学会大会 2006年9月6-8日 札幌

鈴木蓉子、小西行長、斎藤るみ子、一石英一郎、高橋弘毅、東谷篤志

モデル生物線虫Cエレガンスにおける直流強磁場の生物応答の研究

第49回 日本放射線影響学会大会 2006年9月6・8日 札幌

森ちひろ、高浪タカ子、東谷篤志

線虫の*atl-1*(*ATR*遺伝子)によるミトコンドリアDNA複製の制御機構

第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会 2007年12月11-15日 横浜

Tomoko Sugimoto, Chihiro Mori, Takako Takanami, Atsushi Higashitani

C. elegans par2.1/mtssb-1 is essential for mitochondrial DNA replication and its defect causes comprehensive transcriptional alterations including a hypoxia response

The 7th Annual Conference of the Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine 2007, Dec. 20-22, Kagoshima

(3) 著書等その他の発表論文リスト

Higashitani A, Sugimoto T, Dazai K, Sakashita T, Funayama T, Wada S, Hamada N, Kakizaki T, Kobayashi Y.

Effects of microbeam irradiation on G1 arrest and apoptosis in germ cells of *Caenorhabditis elegans*.

JAEA-Reviews. 2005-001.

Higashitani A, Sugimoto T, Mori C, Suzuki Y, Saito R, Ichiishi E, Sakashita T, Hamada N, Wada S, Kakizaki T, Funayama T, Kobayashi Y.

Construction of monitoring system for biological effects of local ionizing radiation using the nematode *C. elegans*.

JAEA-Reviews. 2006-042.

Higashitani A, Mori C, Kimura T, Ikenaga T, Takanami T, Sakashita T, Wada S, Hamada N, Kobayashi Y.

Effect on energetic heavy-ion irradiation on gene expression in *Caenorhabditis elegans*.

JAEA-Reviews. 2007-060.

東谷 篤志.

放射線照射に対する生物応答：モデル生物Cエレガンスを用いたイオンマイクロビームの照射研究.

放射線と産業. 2006; 111, p13-p18

森 ちひろ, 東谷 篤志.

線虫の放射線応答：重イオンマイクロビームを用いた研究結果を中心に.

放射線生物研究. 2006; 41(4), p399-p408

発表論文リスト

Sasagawa Y, Kikuchi K, Dazai K, Higashitani A.

Caenorhabditis elegans Elongin BC complex is essential for cell proliferation and chromosome condensation and segregation during mitosis and meiotic division II. *Chromosome Research*. 2005; 13(4):357-375.

Higashitani A, Higashibata A, Sasagawa Y, Sugimoto T, Miyazawa Y, Szewczyk NJ, Viso M, Gasset G, Eche B, Fukui K, Shimazu T, Fujimoto N, Kuriyama K, Ishioka N.

Checkpoint and physiological apoptosis in germ cells proceeds normally in spaceflown *Caenorhabditis elegans*. *Apoptosis*. 2005; 10(5):949-954.

Sugimoto T, Dazai K, Sakashita T, Funayama T, Wada S, Hamada N, Kakizaki T, Kobayashi Y, Higashitani A.

Cell cycle arrest and apoptosis in *Caenorhabditis elegans* germline cells following heavy-ion microbeam irradiation. *International Journal of Radiation Biology*. 2006; 82(1):31-38.

Sasagawa Y, Sato S, Ogura T, Higashitani A.

C. elegans RBX-2-CUL-5 and RBX-1-CUL-2-based complexes are redundant for oogenesis and activation of the MAP kinase MPK-1. *FEBS Letter*. 2007; 581(1):145-150.

Sugimoto T, Mori C, Takanami T, Sasagawa Y, Saito R, Ichiishi E, Higashitani A.

Caenorhabditis elegans par2.1/mtssb-1 is essential for mitochondrial DNA replication and its defect causes comprehensive transcriptional alterations including a hypoxia response. *Experimental Cell Research*. 2008; 314(1):103-114.

(Selected as "HIGHLIGHTS" in this issue)

Kimura T, Takahashi K, Suzuki Y, Konishi Y, Ota Y, Mori C, Ikenaga T, Takanami T, Saito R, Ichiishi E, Awaji S, Watanabe K, Higashitani A.

The effect of high strength static magnetic fields and ionizing radiation on gene expression and DNA damage in *Caenorhabditis elegans*. *Bioelectromagnetics*. In press.

本報告書収録の学術雑誌等発表論文は本ファイルに登録しておりません。なお、このうち東北大学在籍の研究者の論文で、かつ、出版社等から著作権の許諾が得られた論文は、個別に **TOUR** に登録しております。